

**ZÁRÓJELENTÉS  
(OTKA T049306 )**

**AZ ABERRÁNS HIPERMUTÁCIÓ OKOZTA GENETIKAI  
INSTABILITÁS SZEREPE A B-SEJTES NON-HODGKIN  
LYMPHOMÁK KIALAKULÁSÁBAN ÉS TRANSZFORMÁCIÓJÁBAN**

**TEMATIKUS OTKA PÁLYÁZAT  
ÉLETTUDOMÁNYOK**

Matolcsy András dr.  
Szepesi Ágota dr.  
Csernus Balázs dr.  
Timár Botond dr.  
Gagyí Éva dr.  
Balogh Zsófia

Szemmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet  
Budapest  
2008

**TARTALOMJEGYZÉK**

	oldal
1. A kutatás főbb eredményeinek rövid összefoglalója magyar nyelven	3.
2. A kutatás főbb eredményeinek rövid összefoglalója angol nyelven	3.
3. A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program	3.
4. A tárgykörben kidolgozott módszerek, eljárások	3.
5. Elért eredmények	4.
6. Tudományos közlemények	5.
7. A szerződésben vállaltaktól való eltérés okai	5.
8. Referenciák, szakértői vélemények, hivatkozások	6.
9. A kutatás további lehetséges irányai	7.
10. A kutatás megvalósításához kapott egyéb támogatások	7.

### 1. A kutatás főbb eredményeinek rövid összefoglalója magyar nyelven

A kutatás eredményeként bizonyítottuk, hogy a krónikus lymphocytás leukémia (CLL) és a follicularis lymphoma (FL) kifejezett malignitású lymphomába történő transzformációjában, valamint a mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma (MLBL) kialakulásában szerepet játszik egy napjainkban leírt, aberráns szomatikus hypermutációnak (ASH) nevezett genetikai instabilitás. Ugyancsak bizonyítottuk, hogy azokban a lymphoma transzformációkban és MLBL-ban, ahol ASH van jelen, a centrum germinativum B-sejtek szomatikus hypermutációjáért felelős aktiváció indukálta citidin deamináz (AID) enzim expressziója figyelhető meg. Ezen adataink arra utalnak, hogy a B-sejtes lymphomák lefolyása során az AID enzim aktiválódhat és az egész genomra kiterjedő, köztük a *c-MYC*, a *PAX-5* és a *RhoH* géneket érintő genetikai instabilitás alakulhat ki.

Ugyancsak a pályázat keretében karakterizáltuk a WHO által meghatározott, krónikus lymphocytás leukémia emelkedett számú prolymphocytával (CLL/PL) nevezett entitás biológiai sajátosságait. IgV<sub>H</sub> gén, FISH és high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH) módszerek segítségével magas arányú genomikus amplifikáció és delécio arányokat valamint intenzív klonális szelekciót és evolúciót igazoltunk. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a CLL/PL kialakulásában genomikus instabilitás és klonális evolúció játszhat szerepet.

### 2. A kutatás főbb eredményeinek rövid összefoglalója angol nyelven

As a result of grant support we have provided evidences that in high-grade transformation of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and follicular lymphoma (FL) and development of mediastinal large B-cell lymphoma (MLBL), a recently described genetic instability called aberrant somatic hypermutation (ASH) has a central role. We have also demonstrated that in lymphoma transformation and in MLBL, where tumor cells display ASH, the enzyme which is involved in the somatic hypermutation and switch recombination of germinal center B-cells called activation-induced cytidine deaminase (AID) have high expression. These results suggest that activation of AID enzyme in the natural history of B-cell lymphomas may generate a genome wide genetic instability causing mutations of several genes including *c-MYC*, *PAX-5* and *RhoH*.

We have also characterized the biological features of a WHO lymphoma entity called chronic lymphocytic leukemia with increased prolymphocytes (CLL/PL). Using IgV<sub>H</sub> gene, FISH and high resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH) analysis we have shown high number of genomic imbalances and intensive clonal evolution and selection in the course of the CLL/PL suggesting that a genome wide instability of the neoplastic cells may play a role in the development of the disease.

### 3. A kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program

A pályázat legfőbb célkitűzése az volt, hogy meghatározzuk az aberráns szomatikus hypermutáció (ASH) okozta genetikai instabilitás és az aktiváció indukálta citidin deamináz (AID) enzim szerepét diffúz nagy B-sejtes lymphoma (DLBL) szubtypusok, köztük a mediastinalis nagy B-sejtes lymphoma (MLBL) kialakulásában és a mérsékelt malignitású lymphomák DLBL-be történő transzformációja során. Célunk volt, hogy meghatározzuk az AID enzim expresszió és az ASHM közti összefüggését ezen lymphoma entitásokban.

### 4. A tárgykörben kidolgozott módszerek, eljárások

**4.1. Az ASH okozta genetikai instabilitás meghatározása target gének mutációanalízisével.** Az ASH egy újonnan leírt biológiai folyamat, ahol a fiziológias szomatikus hipermutációs mechanizmus onkogéneken hoz létre aberráns mutációt és ezáltal genetikai instabilitást. Az ASH analízisére a *PIM1*, a *PAX5*, az *RhoH1* és a *MYC* gének mutációs analízisét dolgoztuk ki. A géneket PCR-el amplifikáltuk, majd a PCR termékek DNS szekvenálásával határoztuk meg a mutációk helyét és számát.

**4.2. AID mRNA expresszió meghatározása valós idejű PCR segítségével.** Az AID enzimnek központi szerepe van a fiziológias szomatikus mutáció és nehézlánc átkapcsolás folyamatában. A lymphomákban kialakuló ASH kialakulásában esetlegesen a fokozott AID expresszióknak lehet szerepe, így az AID expresszió mérésére valós idejű PCR-t dolgoztunk ki. A normál értékű AID expressziót centrum germinatívum és perifériás B-sejteken határoztuk meg.

**4.3. AID protein expresszió meghatározása immunhisztokémiai reakció segítségével.** A vizsgálataink során mért AID mRNA expresszió protein szinten való megjelenését immunhisztokémiai módszer beállításával igazoltuk. Az immunhisztokémiai reakcióhoz számos antitest és antigén feltárási eljárás követően TRS Ph6 bizonyult alkalmasnak.

**4.4. High resolution comparative genomic hybridization (HR-CGH).** A DNS nyelés és vesztés szintjén kialakuló genetikai instabilitás meghatározására dolgoztuk ki és állítottuk be a HR-CGH módszert.

## 5. Elért eredmények

**5.1. Aberráns somaticus hipermutáció (ASH) és aktiváció indukálta citidin deamináz (AID) szerepe a mediastinalis diffúz nagy B-sejtes lymphomák (MLBL) kialakulásában.** A MLBL-eken ezidáig végzett genetikai vizsgálatok komplex és multiplex abnormalitásokat találtak. Ezen eredmények alapján merült fel, hogy a fiziológias B-sejt érésben szerepet játszó AID-nek szerepe van egy folyamatos szomatikus hipermutációs aktivitás fenntartásában (ASH). Ezen elképzelés igazolására vizsgáltuk az ASH jelenlétét számos génen (*PIM-1*, *PAX*, *RhoH*, *Myc*) illetve az AID mRNS expresszióját. Eredményeink alapján az ASH és AID expresszió egyaránt szerepet játszik ezen lymphoma entitás kialakulásában. Eredményeinket vezető európai folyóiratban közzétettük (*Br. J. Haematol.* 2005, 129:373)(IF:3.267). Az eredmények Bödör Csaba PhD hallgató téziseinek alapját képezik.

**5.2. Az Aberráns szomatikus hipermutáció (ASH) és az aktiváció indukálta citidin deamináz (AID) szerepe a krónikus lymphocytás leukémia (CLL) transzformációjában és progressziójában.** Igazoltuk, hogy a ASH-nek és AID expresszióknak nincsen szerepe a CLL sejtek kifejlődésében, azonban a betegség progressziója során magas AID expresszió és ASH igazolható. Ezen eredményeink alapján igazolódott az a feltevésünk, miszerint a CLL transzformációja során egy általános genetikai instabilitás kezdődik, melyért feltehetően egy magasabb AID expresszió felelős. Eredményeinket vezető hematológiai folyóiratban közzétettük (*Leukemia* 2006, 20:1089-1095)(IF: 6.612)

**5.3. Az aberráns szomatikus hipermutáció (ASH) szerepe a follicularis lymphoma (FL) transzformációjában és progressziójában.** Irodalmi adatok és saját vizsgálataink alapján a FL egy genetikailag instabil tumor, azonban kialakulásában nem játszik szerepet az ASH. Vizsgálatsorozatainkkal arra kerestünk választ, hogy a FL progressziója során aktiválódik-e az ASH. A kísérletsorozatot kollaborációban végeztük Gaidano Gianluca professzor (Olaszország) munkacsoportjával, mivel transzformálódó FL minták egyik intézetben sem voltak elegendőek önálló vizsgálatsorozat indításához. Eredményeink összhangban a CLL-es transzformáció folyamatával, intenzív ASH-t észleltünk. Ezen eredményink további

bizonyítékot szolgáltatott ahhoz, hogy a lymphoma transzformációban és progresszióban fontos szerepet játszik az ASH. Eredményeinket vezető európai hematológiai folyóiratban közzétük (Haematologica 2006, 91:1405-1409) (IF: 4.575).

**5.4. A krónikus lymphocytás leukémia prolymphocytá szaporulattal járó típus (CLL/PL) molekuláris jellemzése.** A 2001-ben megjelent WHO osztályozás alapján önálló entitásnak nevezett CLL/PL molekuláris jellemzését végeztük el az IgH gén mutációs státuszának, a CLL-re jellemző genetikai eltérések FISH és a tumorsejtek HR-CGH elemzésével. Eredményink arra utalnak, hogy a CLL/PL elsősorban a „mutálatlan” IgH-val rendelkező tumorok közül alakul ki és a tumorban elsősorban random megoszlású genetikai eltérések mutathatóak ki. Ezen adatok is arra utalnak, hogy a progresszív tulajdonságokat öltő indolens lymphomák kialakulásában genetikai instabilitás játszik szerepet. Eredményeinket a Hematol. Oncol. 2007, 25:90-95 (IF: 1.774) folyóiratban közzétük.

## 6. Tudományos közlemények

(A pályázat számának feltüntetésével született közlemények összesített IF-a 20.247)

1. Bödör Cs, Bognár Á, Reiniger L, Szepesi Á, Tóth E, Kopper L, Matolcsy A: Aberrant somatic hypermutation and expression of activation-induced cytidine deaminase mRNA in mediastinal large B-cell lymphoma. Br. J. Haematol. 2005, 129:373-376. (IF:3.267)
2. Reiniger L, Bödör Cs, Balogh Zs, Csomor J, Szepesi Á, Kopper L, Matolcsy A: Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. Leukemia 2006, 20:1089-1095. (IF: 6.612)
3. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi, Barbieri, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A, Pasqualucci L, Capello D, Gaidano G: Abberant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica 2006, 91:1405-1409. (IF: 4.575)
4. Balogh Z, Reiniger L, Deák L, Bödör Cs, Csomor J, Szepesi Á, Gagyí É, Kopper L, Matolcsy A: IgVH gene mutation status and genomic imbalances in chronic lymphocytic leukemia with increased prolymphocytes (CLL/PL). Hematol. Oncol. 2007, 25:90-95 (IF: 1.774)
5. Barna G, Reiniger L, Tátrai P, Kopper L, Matolcsy A: The cut-off levels of CD23 expression in the differential diagnosis of MCL and CLL. Hematol. Oncol. 2008 (in print) (IF: 1.774)
6. Csomor J, Bognár Á, Benedek Sz, Sinkó J, Fekete S, Krenács L, Matolcsy A, Reiniger L: Rare provisional entity: primary cutaneous aggressive epidermotropic CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell lymphoma in a young woman. J. Clin. Pathol. 2008. (in print) (IF: 2.245)

## 7. A szerződésben vállaltaktól való eltérés okai

**7.1. A szerződésben vállalt, azonban nem teljesült kutatások:** A szerződésben vállalt minden kutatást elvégeztünk, azonban a vizsgálatok egy része (AID és ASHM vizsgálata egyéb

DLBL esetben) nem bizonyult olyan mértékben szignifikánsnak, hogy közlemény formájában megjelenjen.

**7.2. A szerződésben nem szereplő, azonban teljesített kutatások:** A lymphomák pathogenetikai kutatása egy dinamikus tudományág, melynek irányvonalai és új aspektusai 4-5 éves periódusban nem számolhatóak ki. Ebből adódóan a pályázat megvalósítása során számos új aspektusa merült fel a lymphoma kutatásnak. Így pl. a szerződésben nem szerepelt CLL/PL molekuláris jellemzése, azonban kialakulását és patogenezisét tekintve progresszív viselkedéssel rendelkezik, így vizsgálata kézenfekvő volt. Ugyancsak nem szerepel a CLL és KL áramláscitometriai differenciáldiagnosztikájában szereplő CD23 antigén eloszlási mintázata. Ezen vizsgálatsorozattal meghatároztuk a két entitás közti különbséget és a napi áramláscitometriai diagnosztikában használható kapuzási értékeket.

## 8. Referenciák, szakértői vélemények, hivatkozások

A pályázati idő alatt megjelent publikációkra ez idáig 6 független hivatkozást kaptunk. A hivatkozások többsége magas IF-al rendelkező folyóiratban jelent meg, ahol eredményeinket a lymphomák pathogeneziséről alkotott elképzelésekbe illesztették be.

Bödör Cs, Bognár Á, Reiniger L, Szepesi Á, Tóth E, Kopper L, Matolcsy A: Aberrant somatic hypermutation and expression of activation-induced cytidine deaminase mRNA in mediastinal large B-cell lymphoma. Br. J. Haematol. 2005, 129:373-376.

**Cancer Research 67:6555-6564, 2007**

**Blood 108:1013-1020, 2006**

**Blood 107:2215-2216, 2006**

**Leukemia 19:2363-2366, 2005**

Reiniger L, Bödör Cs, Balogh Zs, Csomor J, Szepesi Á, Kopper L, Matolcsy A: Richter's and prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia are associated with high mRNA expression of activation induced cytidine deaminase and aberrant somatic hypermutation. Leukemia 2006, 20:1089-1095.

**Haematologica 91: 1405-1409, 2006**

Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi, Barbieri, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A, Pasqualucci L, Capello D, Gaidano G: Abberant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica 2006, 91:1405-1409.

**Cancer Research 67: 2586-2594, 2007**

## 9. A kutatási téma további lehetséges irányai, az eredmények hasznosításának lehetőségei

**9.1. A kutatási téma további lehetséges irányai:** A munkacsoport a lymphoma transzformáció témakörében 1996-óta rendelkezik OTKA kutatási támogatással. A jelen kutatási eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy az ASH és az AID expresszió központi szerepet játszóik a lymphomatranszformáció folyamatában. További kutatási irányvonal lehetne annak a CLL sejtcsoportnak a meghatározása, ahol elindul az AID expresszió és ASH. Elképzeléseink szerint a genetikai instabilitást elindító sejtcsoport talán a nyirokcsomók pseudofolliculusaiban helyezkednek el. Ezen elképzeléseink megvalósításához OTKA pályázatot adtunk be.

**9.2. Az eredmények hasznosításának lehetőségei:** Az eredményink elsősorban a lymphoma alapkutatás területén hoztak új eredményeket, amelyek a lymphomák transzformációjának és patogenezisének jobb megértéséhez vezetnek. Az eredmények mindennapi gyakorlati haszna limitált. Eredményeink alapján az AID expresszió és az ASH korai indikátorai lehetnek a CLL és FL transzformációnak. A CLL/PL-ben végzett vizsgálataink alapján világossá vált, hogy azon CLL esetek, melyek IgH mutációt nem hordoznak, alakul ki prolymphocytá szaporulat. Ezen eredmények alapján a transzformáció kialakulása előtt megállapítható egy adott CLL esetében, hogy potenciálisan transzformálódó tumor vagy sem.

## 10. A kutatás megvalósításához kapott egyéb támogatások

**OTKA T 032572:** „Genetikai instabilitás szerepe a B-sejtes non-Hodgkin lymphomák transzformációjában és klonális szelekciójában” című OTKA pályázatomban folytatását képezte a jelen pályázat. A T32572 pályázat eredményeire épült a jelen pályázat, így a két pályázat eredményei között bizonyos átfedések vannak.

**ETT 144/2003:** „A primer mediastinalis B-sejtes lymphoma pathogenesisiének és molekuláris sajátosságainak vizsgálata” című ETT pályázat hozzájárult e témában végzett vizsgálatainkhoz.